

**Attività scientifica svolta nel 1° anno di Dottorato, Anno Accademico 2017/18**

In questo primo anno di dottorato ho avuto modo di lavorare su due diversi progetti, mettendo a disposizione le mie competenze nell'analisi in fluorescenza dei flussi di Sodio e di Calcio intracellulari; un primo (1) progetto ha visto il coinvolgimento di cardiomiociti isolati da cuore murino o di ratto, il secondo (2) la caratterizzazione di nuove linee di hiPSC-CM commerciali e derivate da paziente con distrofia muscolare di Duchenne.

**Introduzione:** (1) Questo lavoro parte dall'esito dello studio EMPAREG, condotto su pazienti affetti da diabete mellito di tipo II ad alto rischio cardiovascolare; lo studio ha valutato l'efficacia del trattamento con una nuova classe di ipoglicemizzanti orali, bloccanti il cotrasportatore sodio/gluccosio (SGLT2) espresso sul tubulo prossimale e mostra l'efficacia nel determinare una riduzione significativa del 14 % del rischio cardiovascolare, del 38% della mortalità cardiovascolare, del 32% della mortalità per altre cause e una riduzione significativa del 35% dell'ospedalizzazione per scompenso cardiaco rispetto alla terapia standard. Partendo da questi dati, in collaborazione con la professoressa De Angelis di Napoli, siamo andati ad indagare se l'efficacia dell'ipoglicemizzante Empagliflozin e dei suoi analoghi Canagliflozin e Dapagliflozin, fosse correlato ad un effetto acuto sui cardiomiociti confrontando gli effetti del trattamento in acuto, sul modello murino C57, con quello in cronico, sul modello Dahl salt sensitive.

(2) Nell'ambito del progetto Telethon "Un nuovo modello in vitro, basato su cardiomiociti derivati da cellule ips, per studiare i meccanismi della cardiomiopatia associata alla distrofia muscolare di Duchenne (DMD)" condotto da Cecilia Ferrantini, mi sono occupata della caratterizzazione di cardiomiociti ottenuti da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), in modo da approfondire i meccanismi che si sviluppano nelle prime fasi della malattia e conducono poi ai difetti cardiaci noti. Nello specifico abbiamo utilizzato una linea di controllo e una linea derivata da paziente DMD, coltivate su superfici nanostrutturate con diverse caratteristiche di rigidità e spessore; il loro sviluppo è stato valutato a Time Point diversi (60-75-90 gg dalla differenziazione) sulla base della cinetica e dell'ampiezza del transiente di calcio e del potenziale d'azione. Nella distrofia muscolare di Duchenne il muscolo risulta suscettibile a lacerazione durante la contrazione a causa della totale assenza di distrofina, proteina che ancora il citoscheletro di una fibra muscolare alla matrice extracellulare; questo porta nel soggetto affetto, all'insorgenza di cardiomiopatie anche se ancora non si è ben compreso quali siano le alterazioni nello sviluppo cardiaco associate alla perdita di distrofina.

**Metodi:** (1) Utilizzando il modello murino C57 R92Q, trattato in acuto, e il modello Dahl-Salt sensitive (dal laboratorio della professoressa De Angelis), trattato invece in cronico, abbiamo effettuato l'isolamento dei cardiomiociti, sfruttando una digestione prima enzimatica, con Liberasi, e poi meccanica. Dopo aver incubato e marcato le cellule ottenute con dye fluorescente legante il calcio, CAL520, abbiamo misurato l'andamento del transiente di calcio; le cellule ottenute dal modello C57 sono state superfuse, in condizione di controllo, con soluzione Tyrode e successivamente con la stessa soluzione contenente il farmaco 10 $\mu$ M (Canagliflozin o Dapagliflozin o Empagliflozin) per poter così valutare l'effetto dell'esposizione acuta. Il protocollo utilizzato prevedeva una stimolazione di campo a diverse frequenze (3-5-7Hz) applicate in sequenza e l'applicazione di una pausa dalla stimolazione di 30 sec alla fine del protocollo, per valutare l'eventuale attività spontanea.

2) Colture cellulari a lungo termine su superfici nanostrutturate sono state marcate a diversi time point (60-75-90 giorni) con dye fluorescenti sensibili al voltaggio di membrana o leganti il calcio,

rispettivamente Fluovolt e Cal630, per descrivere appunto le cinetiche e l'ampiezza del potenziale di membrana e del transiente di calcio. Le linee cellulari utilizzate sono state una linea di controllo (DMD AExon1) e una linea hiPSC-Cms derivata da un paziente DMD (DMD-AExon50). Alle cellule marcate e adese alla superficie nanostrutturata su vetrino è stato applicato un protocollo di stimolazione a due frequenze (1Hz e 3Hz) alle quale segue una pausa priva di stimolazione per la valutazione degli eventi spontanei; un altro protocollo ha previsto l'applicazione di una stimolazione di campo a 3Hz, poi stoppata per circa 30 sec e ripresa successivamente; questo protocollo serve alla valutazione del potenziamento del picco di calcio a seguito di una pausa che permette l'accumulo del calcio nel reticolo sarcoplasmatico (*post-rest potentiation*); un mancato potenziamento del picco indica un alterato sviluppo del reticolo o un'alterata espressione di canali sulla membrana sarcoplasmatica.

**Conclusioni:** (1) I farmaci ipoglicemizzanti utilizzati (Empagliflozin, Canagliflozin e Dapagliflozin) a seguito del trattamento acuto non si sono mostrati capaci di ripristinare le alterazioni tipiche dei modelli animali utilizzati (C57 R92Q), né nell' ampiezza né nelle cinetiche del transiente di calcio. Nel modello Dahl Salt sensitive, dove la cardiopatia è indotta dalla somministrazione di Sali colici, il trattamento farmacologico in cronico è stato effettuato con il solo Dapagliflozin per circa 3 mesi. Nelle cellule isolate da cuori di animali DS non trattati o trattati con dapaglifozin si sono osservate invece differenze statisticamente significative. In particolare, il trattamento ha comportato una riduzione del numero di eventi spontanei, una riduzione delle concentrazioni diastoliche dello ione calcio e un aumento dell'ampiezza del transiente di calcio indotto da stimolazione. La presenza di effetti positivi a seguito di un trattamento cronico e non acuto lascia presupporre che non ci sia un effetto diretto acuto degli ipoglicemizzanti sui canali di membrana o in generale su meccanismi di controllo dell'omeostasi del calcio dei cardiomiociti e che quindi la risposta positiva dell'apparato cardiovascolare al trattamento in cronico sia da ricercare in altri meccanismi oggetto di ulteriori indagini.

(2) Nei cardiomiociti derivati da iPSC di controllo abbiamo osservato ai diversi step di maturazione un prolungamento della durata del potenziale d'azione, un incremento dell'ampiezza del transiente di calcio (CaT) e un incremento delle cinetiche (Time to peak e decadimento del transiente  $RT_{50}$ ). Paragonate ai controlli, le linee DMD mostrano un accorciamento della durata del potenziale d'azione (APD), una riduzione dell'ampiezza del transiente e anche un rallentamento delle cinetiche sebbene venga mantenuta la correlazione positiva tra la durata del potenziale d'azione (APD) e l'ampiezza del transiente di Ca (CaT). Nei modelli DMD non si nota però nessun incremento nell'ampiezza del picco di calcio dopo il protocollo per la misura della *post-rest potentiation*. Questo fa pensare a uno squilibrio nella maturazione del reticolo sarcoplasmatico, meccanismo che potrebbe rappresentare una delle cause eziopatogeniche della disfunzione cardiomiocitaria, capaci poi di degenerare a livello dell'intero organo nel tipico quadro di cardiomiopatia. Inoltre, dallo studio su diverse superfici nanostrutturate, abbiamo visto come esse diano luogo, al medesimo time point, ad ampiezze diverse del transiente di calcio. Ciò può indicare che modifiche al substrato di crescita del tessuto, come nel caso della DMD, possono causare alterazioni nello sviluppo dei cardiomiociti che poi si ripercuotono sull'intera funzionalità cardiomiocitaria. L'aspetto infine più rilevante è la possibilità di disporre di un modello di DMD in vitro atto allo studio di meccanismi patogenetici e possibile "rescue" mediante trattamenti.

- Partecipazione al congresso Frontiers in CardioVascular Biology in Vienna Aprile 19-22/2018 con il poster dal titolo: "Electrophysiological characterization of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from Duchenne Muscular Dystrophy"
- Br J Pharmacol. 2018 Jul;175(13):2635-2652. doi: 10.1111/bph.14223. Epub 2018 May 3.  
"Late sodium current inhibitors to treat exercise-induced obstruction in hypertrophic cardiomyopathy: an in vitro study in human myocardium."  
Ferrantini C Pioner JM, Mazzone L, Gentile F, Tosi B, Rossi A, Belardinelli L, Tesi C, Palandri C, Matucci R, Cerbai E, Olivetto I, Poggesi C, Mugelli A, Coppini R.
- Soggiorno nel laboratorio della professoressa C.A. Remme presso l'Accademic Medical Centre di Amsterdam nel dipartimento di Experimental Cardiology da 1/09/18 fino a 1/03/19

